

УДК: 577.31

Анализ динамических режимов взаимодействующих синтетических генетических репрессилаторов

И. С. Потапов^{1,a}, Е. И. Волков^{2,b}

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы

²Физический институт имени П. Н. Лебедева Российской академии наук,
Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинский проспект, д. 53

E-mail: ^a elias.potapov@gmail.com, ^b volkov@td.lpi.ru

Получено 28 октября 2010 г.

В работе изучена динамика двух искусственных генетических осцилляторов — репрессилаторов, — связанных диффузией аутоиндуктора. Выбрана модель генетической сети, в которой производство, диффузия и ген-мишень для аутоиндуктора обеспечивают расталкивающее взаимодействие между фазовыми точками. Исследовано появление периодических режимов, устойчивых неоднородных стационарных состояний в зависимости от главных бифуркационных параметров: силы связи и скорости синтеза мРНК. Показано, что добавление в генетическую схему аутоиндуктора приводит к исчезновению предельного цикла через бифуркацию бесконечного периода в изолированном осцилляторе, если скорость синтеза мРНК велика. Найден гистерезис между предельным циклом и стационарным состоянием, размер которого зависит от соотношения времен жизни мРНК и белков. Взаимодействие двух осцилляторов приводит к появлению устойчивого противофазного предельного цикла, который может переходить в хаотический режим через «тор-хаос» или путем каскада Фейгенбаума.

Ключевые слова: осциллятор, генетическая сеть, аутоиндуктор, бифуркационный анализ

Dynamics analysis of coupled synthetic genetic repressilators

I. S. Potapov¹, E. I. Volkov²

¹Lomonosov Moscow State University, GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

²Lebedev Physical Institute RAS, Leninskij prospekt, 53, Moscow, 119991, Russia

Abstract. — We have investigated dynamics of synthetic genetic oscillators — repressilators — coupled through autoinducer diffusion. The model of the system with phase-repulsive coupling structure is under consideration. We have examined emergence of periodic regimes, stable inhomogeneous steady states depending on the main systems' parameters: coupling strength and maximal transcription rate. It has been shown that autoinducer production module added to the isolated repressilator cause the limit cycle to disappear through infinite period bifurcation for sufficiently large transcription rate. We have found hysteresis of limit cycle and stable steady state the size of which is determined by ratio between mRNA and protein lifetimes. Two coupled oscillators system demonstrates stable anti-phase oscillations which can become a chaotic regime through invariant torus emergence or via Feigenbaum scenario.

Keywords: oscillator, genetic circuit, autoinducer, bifurcation analysis

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2010, vol. 2, no. 4, pp. 403–418 (Russian).

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 080200682

Введение

С развитием методов геной инженерии появилась возможность конструирования генетических схем, демонстрирующих запрограммированное поведение. Примерами таких искусственных конструкций могут служить триггерные схемы [Gardner, Cantor, Collins, 2000; Development of genetic circuitry exhibiting ... in Escherichia coli, 2003], применение которых на практике (в качестве переключателей, реагирующих на те или иные внешние воздействия, элементов хранения двоичного кода) кажется довольно реальным. Следует отметить, что модель биохимической регуляции белкового синтеза, предложенная Жакобом и Моно в 1964 г. для описания двух альтернативно связанных систем синтеза белка, когда продукт первой системы является корепрессором второй системы и наоборот, является первой моделью триггерного типа [Ризниченко, 2002].

Математическая модель генетического триггера была предложена Д. С. Чернавским с соавторами в 1967 г. [Григоров, Полякова, Чернавский, 1967].

Сравнительно недавно были экспериментально реализованы конструкции, проявляющие колебательное поведение, т. н. генетические осцилляторы [Elowitz, Leibler, 2000; Development of genetic circuitry exhibiting ... in Escherichia coli, 2003; A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator, 2008; A tunable synthetic mammalian oscillator, 2009].

Интерес к искусственным генетическим осцилляторам вызван стремлением разработать теоретические и экспериментальные модели для изучения таких ключевых биологических процессов как клеточный цикл и циркадные ритмы.

Созданные генетические элементы — плазмиды — с заданной структурой взаимодействия генов переносятся, как правило, в бактериальную клетку. Переносимые гены обычно кодируют регуляторные белки, которые активируют или ингибируют синтез мРНК, а в конечном счете и полипептидных цепей, с генов того же самого вектора. Таким образом осуществляется желаемая топология схемы. Гены могут кодировать и функциональные белки, которые будут влиять на метаболические процессы клетки, таким образом можно создавать смешанные генно-метаболические сети.

С точки зрения нелинейной физики все изучаемые искусственные схемы идейно просты. Так, триггерные схемы состоят из двух элементов, каждый из которых ингибирует соседний. Такая схема характеризуется двумя устойчивыми стационарными состояниями: полная экспрессия первого элемента и отсутствие экспрессии второго и наоборот [Gardner, Cantor, Collins, 2000]. В свою очередь, генетический осциллятор [Elowitz, Leibler, 2000], названный *репрессилатором*, состоит как минимум из трех элементов, каждый из которых однонаправленно ингибирует соседний. Если имеются элементы *A*, *B* и *C*, тогда топология сети устроена следующим образом: *A* подавляет синтез *B*, *B* подавляет синтез *C* и *C*, замыкая цикл, подавляет синтез *A* (рис. 1).

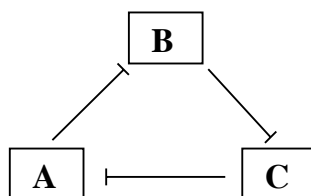


Рис. 1. Три элемента ингибируют друг друга в циклическом порядке: белок каждого элемента подавляет синтез мРНК с гена соседнего элемента

Четное количество элементов, связанных однонаправленно отрицательными связями и замкнутых этими связями в цикл, можно рассматривать как простейший триггер с двумя элементами. Нечетное количество элементов, связанных однонаправленно отрицательными связями и замкнутых этими связями в цикл, образуют колебательный контур [A generalized model of the repressilator, 2006].

Математическая модель системы, представленной на рис. 1, имеет следующий вид [Elowitz, Leibler, 2000]:

$$\begin{aligned} \frac{dm_i}{dt} &= -m_i + \frac{\alpha}{1+p_j^n} + \alpha_0, & (i = A, B, C) \\ \frac{dp_i}{dt} &= \beta(m_i - p_i), & (j = C, A, B). \end{aligned} \quad (1)$$

Каждый элемент осциллятора представляется мРНК (m_i) и белком (p_i). Изменение во времени концентрации мРНК описывается процессами синтеза (с учетом репрессии со стороны белков, кодирующихся соседними генами) и деградации. Репрессия описывается функцией $\frac{\alpha}{1+p_j^n}$, где p_j — концентрация белка репрессора для i -ой мРНК, n — коэффициент кооперативности, α — скорость транскрипции в отсутствие репрессора, α_0 — утечка промотора. Предполагается, что динамика белков представлена линейными процессами синтеза и деградации; β — отношение константы скорости деградации белка к константе скорости деградации мРНК.

Следующим этапом в исследовании репрессилаторов было введение связи между осцилляторами. Связь основывается на системе кворум-сенсинга [Waters, Bassler, 2005] и обеспечивается введением двух генов, кодирующих: а) белок, синтезирующий маленькую молекулу (аутоиндуктор), способную диффундировать из межклеточного пространства в клетки; б) белок, который является свободным рецептором аутоиндуктора и в комплексе с ним активирует транскрипцию с генов клетки. Такая связь учитывает изменения в плотности популяции клеток.

Предполагается, что белок, рецептор аутоиндуктора, находится в избытке [Dockery, Keener, 2001], поэтому в математическую модель концентрация этого белка не входит. Принципиальным является то, как аутоиндуктор влияет на каждый отдельный осциллятор. В известных моделях репрессилатора аутоиндуктор активирует транскрипцию с гена C , а белок, синтезирующий аутоиндуктор, в математическом плане эквивалентен одному из белков репрессилатора [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004; Multistability and clustering in a population of ..., 2007].

В работе [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004] белок A является ферментом в процессе синтеза аутоиндуктора, который действует на мРНК C , активируя ее синтез. Такая топология обеспечивает притягивающую связь — аутоиндуктор подавляет собственный синтез. В результате была показана возможность синфазной синхронизации слегка расстроенных репрессилаторов, но данная модель может демонстрировать и другие режимы (в печати).

В работе [Multistability of synthetic genetic networks ..., 2008] белок B является ферментом в процессе синтеза аутоиндуктора, который действует на мРНК C , активируя ее синтез. Такая топология обеспечивает расталкивающую связь — аутоиндуктор стимулирует собственный синтез. Было показано, что в этом варианте модели отсутствуют устойчивые синфазные колебания и имеются устойчивые противофазные колебания. В работе [Multistability and clustering in a population of ..., 2007] проводился бифуркационный анализ по параметру плотности популяции, так как он легко изменяется в процессе возможного эксперимента. Однако другие ключевые параметры — скорость транскрипции, отношение констант скоростей деградации белка и мРНК, скорость диффузии, скорость производства аутоиндуктора — могут принципиально менять динамическое поведение.

В настоящей работе мы исследуем динамическое поведение одного и двух репрессилаторов с кворум-сенсингом в зависимости от параметра, описывающего приток реагентов в систему (максимальная скорость транскрипции), учитывая роль различия характерных времен динамики переменных осциллятора (РНК и белков).

В данной работе для одного репрессилатора с производством аутоиндуктора показано наличие устойчивого стационарного состояния, не связанного с рождением предельного цикла.

Также показано, что отношение констант деградации белка и мРНК влияет на размер области существования (гистерезиса) устойчивого стационарного состояния и устойчивого предельного цикла.

Проведен бифуркационный анализ по параметру скорости транскрипции для системы двух репрессилляторов. Показан переход к режиму динамического хаоса по сценарию Фейгенбаума.

Генные сети из взаимодействующих осцилляторов

Чувство плотности популяции (кворум-сенсинг)

Давно замечено, что некоторые виды бактерий обладают системой коммуникации, которая способна отслеживать плотность клеток. Способность клеток реагировать на изменение плотности и функционировать как целое сообщество, а не разрозненные клетки, достигается взаимодействием по типу кворумного механизма. По-видимому, самым известным примером микроорганизма такого рода является симбиотическая морская бактерия *Vibrio fischeri*. При достижении критической плотности популяции микроорганизма включается транскрипция с группы генов, продукты которых индуцируют биолюминесценцию.

На молекулярном уровне межклеточная сигнализация основана на небольшой молекуле (аутоиндуктор, AI), белке (I), ответственном за синтез AI, и активаторе транскрипции. Активатор транскрипции, специфический R-белок, сам не является активным, но комплекс R-белок/AI связывается с регуляторными последовательностями ДНК вблизи целевых генов, усиливая их транскрипцию. R-белок экспрессируется конститутивно в клетке, и считается, что он находится всегда в избытке [Dockery, Keener, 2001]. Аутоиндуктор может свободно диффундировать через клеточную мембрану и быстро перемешиваться во внешней среде, что является основой для предположения о квазистационарности концентрации аутоиндуктора в среде.

Динамическое поведение аутоиндуктора описывается уравнением [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004]:

$$\dot{S}_i = -k_{s0}S_i + k_{s1}I - \eta(S_i - S_e), \quad (2)$$

$$\dot{S}_e = -k_{se}S_e - \eta_{ext}(S_e - \sum_{i=1}^N S_i). \quad (3)$$

В этих уравнениях использованы следующие обозначения: S_i — концентрация аутоиндуктора в i -ой клетке, S_e — концентрация аутоиндуктора во внешней среде, I — белок, ответственный за синтез AI, N — общее число клеток. Аутоиндуктор внутри клетки претерпевает деградацию (k_{s0}) и синтез посредством белка I (k_{s1}) и диффундирует (η) во внешнюю среду. Аутоиндуктор во внешней среде подвержен распаду (k_{se}) и возврату (η_{ext}) в клетки.

Далее, применяя приближение о квазистационарности ($\dot{S}_e \equiv 0$) [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004]:

$$S_e = \frac{\eta_{ext}N}{k_{se} + \eta_{ext}N} \bar{S} \equiv Q\bar{S}. \quad (4)$$

Здесь $\bar{S} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_i$.

Константа скорости диффузии пропорциональна $\frac{1}{V_{ext}}$. Отсюда

$$0 < Q \sim \frac{N/V_{ext}}{k_{se} + N/V_{ext}} < 1,$$

где N/V_{ext} — плотность популяции. Таким образом, внешняя концентрация аутоиндуктора напрямую зависит от плотности популяции клеток. В итоге поведение AI описывается одним уравнением для внутренней концентрации [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004]:

$$\dot{S}_i = -k_{so}S_i + k_{s1}I - \eta(S_i - Q\bar{S}). \quad (5)$$

В такой формулировке можно видеть принципиальное отличие связи по кворумному механизму от связи «все-со-всеми», которая широко применяется при изучении фазовых осцилляторов, нейронов, электрохимических элементов и в которой нет эффекта разбавления концентрации сигнальных молекул в среде. Член связи в уравнении (5) управляется двумя параметрами, один из которых (Q) позволяет изучать эффект влияния плотности популяции. Роль разбавления сигнальных молекул в среде оказалась существенной при изучении динамики связанных гликолитических осцилляторов [Dynamical quorum sensing: ..., 2007].

Репрессия с кворумным механизмом взаимодействия

Учитывая все вышеизложенное, появляется возможность описания популяции генетических осцилляторов, взаимодействующих по типу кворум-сенсинга. В работах [Synchronizing genetic relaxation oscillators ..., 2002; García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004; Multistability and clustering in a population of ..., 2007; Synchronization of genetic oscillators, 2008] предложены теоретические схемы для описания таких систем.

На примере математических моделей [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004; Synchronizing genetic relaxation oscillators ..., 2002] и в реальном эксперименте [A synchronized quorum of genetic clocks, 2010] было показано, что кворум-сенсинг обеспечивает синфазную синхронизацию популяции искусственных генетических осцилляторов.

Для внедрения системы кворум-сенсинга в репрессилатор необходимо определиться с целевым геном, на который будет действовать комплекс аутоиндуктора с белком активатором, и с белком, который синтезирует аутоиндуктор (I в ур. (5)).

В имеющихся схемах репрессилатора с кворум-сенсингом [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004; Multistability and clustering in a population of ..., 2007; Synchronization of genetic oscillators, 2008] рабочий комплекс R/AI активирует транскрипцию с гена C .

Белок, производитель аутоиндуктора, можно поставить под ингибиторный контроль одного из трех белков репрессилатора. Известно [García-Ojalvo, Elowitz, Strogatz, 2004; Multistability and clustering in a population of ..., 2007], что этот выбор существенно влияет на коллективную динамику. Мы будем использовать вариант модели, предложенной в [Multistability and clustering in a population of ..., 2007] (схема на рис. 2).

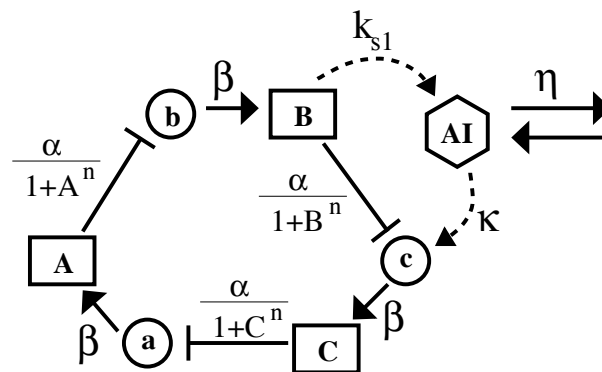


Рис. 2. Схематическое изображение взаимодействия молекул в репрессилаторе с кворум-сенсингом в случае расталкивающей связи. Пояснения в тексте

В работе [Multistability of synthetic genetic networks . . . , 2008] было показано существование устойчивого противофазного колебательного решения в системе из двух осцилляторов. Наряду с этим были обнаружены устойчивые однородные и неоднородные стационарные решения, устойчивые неоднородные колебания. В физиологических областях параметров был обнаружен режим динамического хаоса. Таким образом схема с расталкивающей связью демонстрирует разнообразие динамического поведения.

В работе [Multistability of synthetic genetic networks . . . , 2008] была изучена роль параметра «кворумной» связи Q в системе из двух клеток-репрессилаторов при фиксировании остальных параметров. Исследование динамического поведения системы в столь ограниченной области параметров не дает полной картины.

В работе будут использованы следующие обозначения: a , b и c — концентрации молекул мРНК; A , B и C — концентрации соответствующих белков; S — концентрация молекул аутоиндуктора; i — номер осциллятора.

Динамика молекул мРНК описывается процессами деградации, синтеза с учетом репрессии и активации (только для мРНК c):

$$\begin{aligned}\dot{a}_i &= -a_i + \frac{\alpha}{1 + C_i^n}, \\ \dot{b}_i &= -b_i + \frac{\alpha}{1 + A_i^n}, \\ \dot{c}_i &= -c_i + \frac{\alpha}{1 + B_i^n} + \kappa \frac{S_i}{1 + S_i},\end{aligned}\tag{6}$$

где α — максимальная скорость притока (транскрипции) мРНК, т.е. в отсутствие белка-репрессора. α определяет единственный приток вещества в систему: на основе мРНК синтезируется белок, а из белка — аутоиндуктор. Утечка промотора равна нулю, то есть $\alpha_0 = 0$ (ср. с (1)).

Функция $\frac{\alpha}{1 + P^n}$ определяет реессию (подавление) синтеза соответствующей мРНК с коэффициентом кооперативности n и концентрацией белка-репрессора P .

Функция $\kappa \frac{S}{1 + S}$ определяет активацию целевого гена комплексом R-белок/AI системы кворум-сенсинга. Активация ограничена притоком R-белка. κ — максимальная скорость транскрипции с промотора гена, кодирующего R-белок. S — концентрация аутоиндуктора.

Переменные нормированы на константу скорости деградации мРНК.

Динамика молекул белка описывается линейными процессами синтеза и деградации:

$$\begin{aligned}\dot{A}_i &= \beta_a(a_i - A_i), \\ \dot{B}_i &= \beta_b(b_i - B_i), \\ \dot{C}_i &= \beta_c(c_i - C_i),\end{aligned}\tag{7}$$

где β_i — отношение константы скорости деградации белка к константе скорости деградации соответствующей мРНК. Иначе, β_i определяет отношение времени жизни мРНК к времени жизни соответствующего белка.

Динамика аутоиндуктора определяется уравнением (5) при $I = B_i$.

Уравнения (5), (6), (7) образуют полную систему.

Изолированный репрессиллятор с производством аутоиндуктора

Появление в системе дополнительной молекулы — AI — влияет на динамику одиночного репрессиллятора. Рассмотрим влияние параметров, так или иначе связанных с AI, на изменение границы колебаний, имеющих место в системе (5), (6), (7) при $Q = 0$ и $i = 1$. Влияние среднего поля концентраций AI в среде отсутствует, и диффузия AI из клетки (η) является дополнительным вкладом в деградацию вещества, так как аутоиндуктор в среде ни на что не влияет.

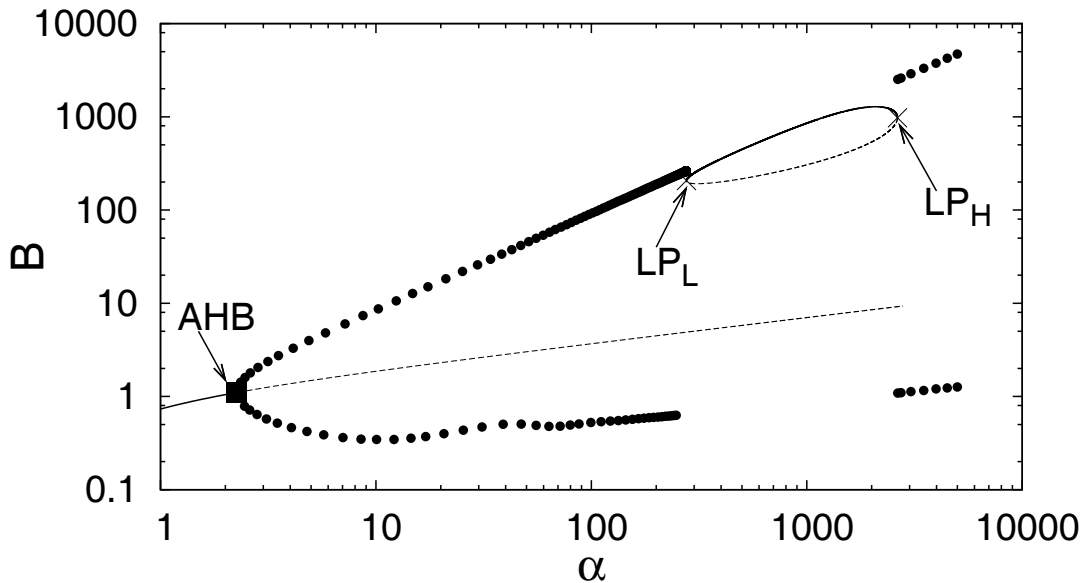


Рис. 3. Рождение автоколебаний в одиночной клетке через бифуркацию Андронова–Хопфа (АНВ, закрашенный квадрат) по параметру α , максимальная скорость транскрипции. LP_L , LP_H — седло-узловые бифуркации стационарного состояния. Параметры, использованные для расчета: $n = 2,6$, $\kappa = 25,0$, $\beta_a = \beta_b = \beta_c \equiv 1,0$, $k_{s0} = 1,0$, $k_{s1} = 0,01$, $\eta = 2,0$, $Q = 0,0$

На однопараметрических бифуркационных диаграммах в этой работе показаны значения одной из переменных системы в зависимости от выбранного параметра. Для стационарных решений такое значение одно, отвечающее собственно стационарному во времени уровню компоненты системы. Для периодических решений таких значений два: максимум и минимум осцилляций. Устойчивые стационарные решения обозначаются сплошной линией, а неустойчивые — пунктиром. Устойчивые колебательные решения обозначаются закрашенными кругами, а неустойчивые — пустыми [Doedel, 1981].

На рис. 3 показано появление устойчивых колебаний в системе одиночного осциллятора при изменении скорости максимального притока молекул мРНК (α). На рисунке видно, что система переходит из устойчивого стационарного состояния в режим предельного цикла при достижении критического значения α (бифуркации Андронова-Хопфа, АНВ). Предельный цикл устойчив в широком интервале скоростей транскрипции α и претерпевает бифуркацию бесконечного периода (IPB) вблизи седло-узловых бифуркаций LP_L и LP_H стационарного состояния при больших значениях скорости транскрипции (рис. 3).

Устойчивое стационарное состояние при больших значениях скорости транскрипции обеспечивается высокой концентрацией аутоиндуктора, которая, в свою очередь, обеспечивается высоким содержанием белка В в системе. Таким образом, белок В играет двойную роль: с одной стороны, реализует ингибирование синтеза мРНК c , что является необходимым для колебатель-

ной функции репрессилатора; с другой — активирует синтез той же самой мРНК c через синтез аутоиндуктора. В этом проявляется специфика расталкивающей связи.

Ингибирование синтеза мРНК c осуществляется напрямую белком B , что выражается функцией $\frac{\alpha}{1+B^n}$, а активация синтеза мРНК c белком B происходит через промежуточную стадию синтеза аутоиндуктора, концентрация которого входит в активационную функцию $\kappa \frac{S}{1+S}$. Поэтому активация происходит через некоторое время после ингибирования, и это время меньше периода колебаний. Появление дополнительных молекул мРНК c в системе происходит «не в такт» основным колебаниям репрессилатора.

Степень активации определяется скоростью транскрипции α , которая пропорциональна амплитуде колебаний. Таким образом, при больших значениях скорости транскрипции дополнительный вклад в синтез мРНК c через активацию может быть достаточно большим, чтобы предельный цикл претерпел бифуркацию бесконечного периода.

Целесообразно провести анализ изменения границ устойчивости предельного цикла в зависимости от параметров производства (k_{s1}) и оттока (η) аутоиндуктора.

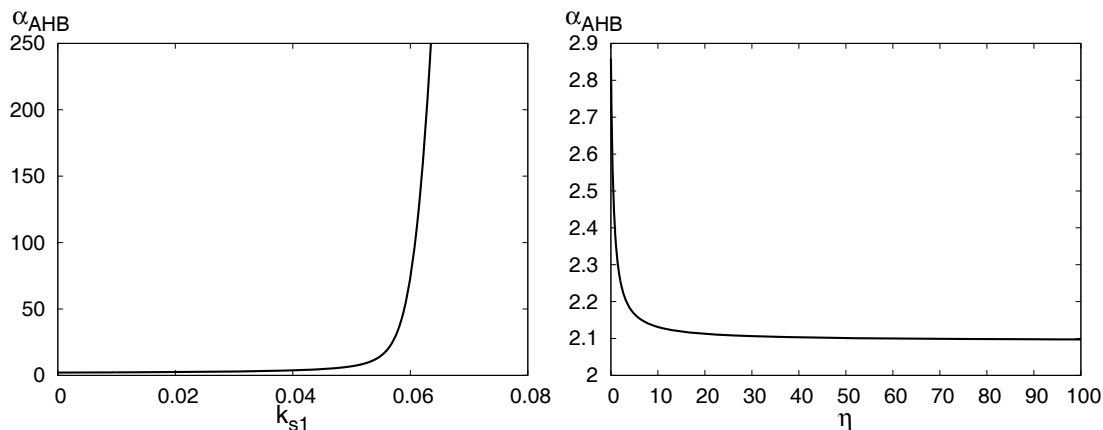


Рис. 4. Нижняя граница колебаний одиночного осциллятора по α (АНВ). Рисунки получены двухпараметрическим продолжением АНВ по α и k_{s1} (слева) или α и η (справа). Параметры — как на рис. 3

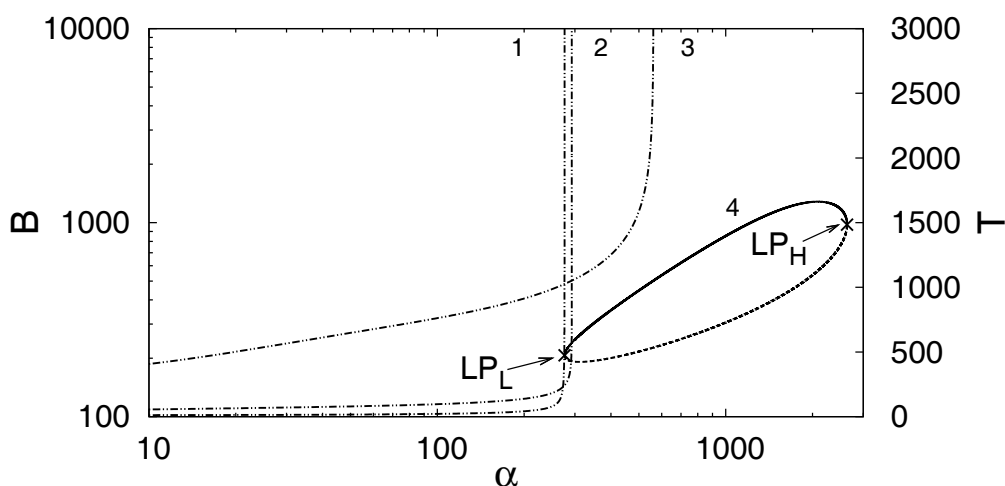


Рис. 5. Сосуществование (гистерезис) колебательного и стационарного решений. Кривые 1, 2 и 3 показывают зависимость периода (T) предельного цикла от скорости транскрипции α . Кривая 4 — стационарное состояние. Кривая 1: $\beta_a = \beta_b = \beta_c \equiv \beta = 1,0$. Кривая 2: $\beta = 0,1$. Кривая 3: $\beta = 0,01$. Кривая 4 не зависит от выбора параметров β_i . Остальные параметры — как на рис. 3

На рис. 4 показано изменение значения α в точке АНВ ($\alpha_{АНВ}$) в зависимости от производства аутоиндуктора (левый рисунок) и его диффузии в среду (правый рисунок). Заметны незначительные изменения $\alpha_{АНВ}$ при изменении скорости диффузии аутоиндуктора η , то есть скорость оттока аутоиндуктора в среду не влияет значительно на величину скорости транскрипции, необходимой для рождения предельного цикла в изолированном осцилляторе ($\alpha_{АНВ}$). Однако положение $\alpha_{АНВ}$ в значительной степени меняется при изменении скорости производства АИ.

Верхняя граница колебаний одиночного репрессилатора определяется устойчивым стационарным состоянием в области больших значений скорости транскрипции α . Колебания исчезают через бифуркацию бесконечного периода (IPB), то есть предельный цикл «налипает» на стационарное состояние. Значение α , при котором происходит такое «налипание», определяется параметрами β_i за счет изменения поведения предельного цикла, так как стационарное состояние не изменяется (рис. 5). Так, продолжение предельного цикла по параметру на рис. 3 прекращается вблизи $\alpha_{cr} \approx \alpha(LP_L)$ (кривая 1 на рис. 5), сосуществования колебаний и стационарного состояния не наблюдается. Если уменьшить значения параметров β_i до 0,01, наблюдается гистерезис: сосуществование решений — колебательного и стационарного. При определенных параметрах β_i возможен случай наличия гистерезиса на всем интервале существования стационарного состояния (результаты не показаны).

Необходимо также определить, как зависят границы стационарного состояния от параметров, управляющих динамикой аутоиндуктора, так как стационарное состояние является первопричиной «налипания» предельного цикла, а аутоиндуктор является причиной появления устойчивого стационарного состояния.

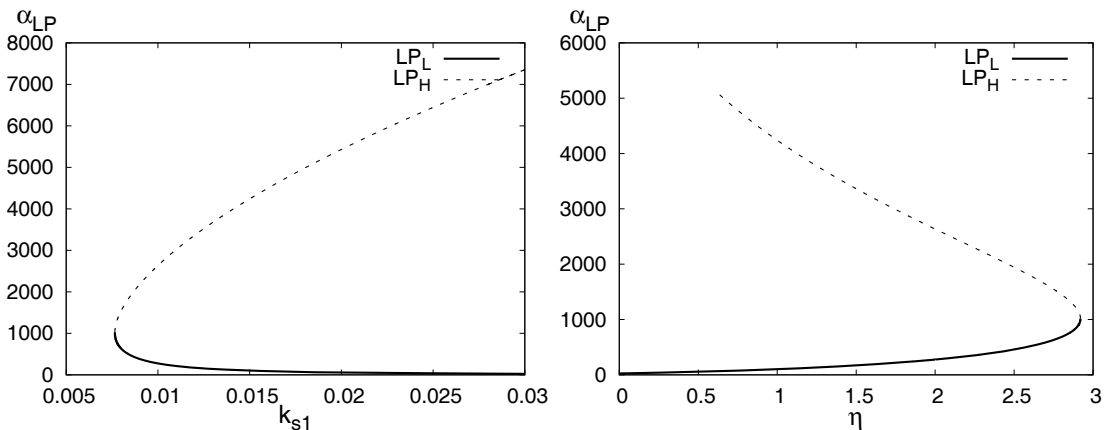


Рис. 6. Границы стационарного состояния (LP_L и LP_H) по α (скорости транскрипции) — как функция от констант производства аутоиндуктора k_{s1} (слева) и скорости диффузии аутоиндуктора η (справа)

Мы ограничимся рассмотрением производства и диффузии (оттока) аутоиндуктора. На рис. 6 видно, что стационарное состояние появляется после некоторой пороговой величины константы производства k_{s1} , и размер области по α растет с увеличением этой величины. Стационарное состояние исчезает после определенного значения скорости диффузии η , и размер области по α уменьшается с увеличением этого параметра.

В отличие от нижней границы колебаний одиночного осциллятора $\alpha_{АНВ}$, которая слабо зависела от скорости оттока η АИ в среду, границы стационарного состояния, которое в определенной степени, наряду с параметрами β_i , характеризует верхнюю границу колебаний, сильно изменяются с изменением η .

Скорость производства АИ k_{s1} значительно влияет на положение верхней и нижней границ колебаний.

Два репрессилатора, связанные посредством кворум-сенсинга

Анализ динамических режимов двух связанных репрессилаторов можно проводить по параметру кворума Q , что было проделано в работе [Multistability of synthetic genetic networks ..., 2008], а также по максимальной скорости транскрипции α , и результаты дополняют друг друга.

Анализ по параметру кворум сенсинга Q

Основное продолжение стационарного состояния по параметру связи для $\alpha < \alpha_{LP}$ показано на рис. 7. Эта диаграмма качественно не отличается от той, что получена в [Multistability and clustering in a population of ..., 2007], но мы использовали одинаковые значения параметров $\beta_i = 0,1$.

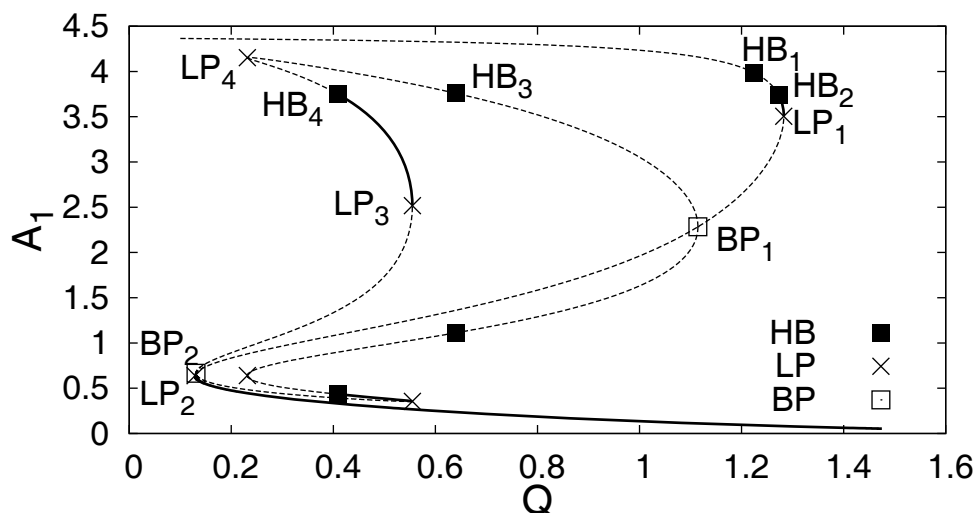


Рис. 7. Главная бифуркационная диаграмма продолжения по параметру кворум-сенсинга Q . Обозначения: HB — бифуркация Андронова-Хопфа, LP — седло-узловая бифуркация, BP — бифуркация потери симметрии. Параметры, использованные для расчета: $N = 2$, $\alpha = 216$, $n = 2,6$, $\kappa = 25,0$, $\beta_a = \beta_b = \beta_c \equiv 0,1$, $k_{s0} = 1,0$, $k_{s1} = 0,01$, $\eta = 2,0$. Физически значимая область исследуемого параметра — $0 \leq Q \leq 1$

Система из двух осцилляторов с расталкивающей связью демонстрирует значительное количество динамических режимов. Устойчивое однородное стационарное состояние возникает вследствие бифуркации LP_2 и соответствует стационарному состоянию изолированного осциллятора. Неоднородное устойчивое стационарное состояние в системе появляется вследствие потери симметрии через бифуркации BP_1 и BP_2 (рис. 7).

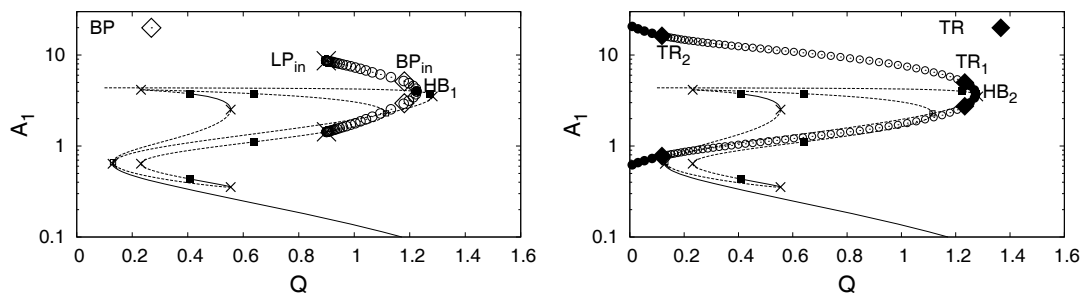


Рис. 8. Синфазные (слева) и противофазные (справа) колебания. Параметры — как на рис. 7. BP — бифуркация потери симметрии, TR — бифуркация рождения инвариантного тора

На рис. 8 показана ветка неустойчивого синфазного колебательного решения, рождающаяся в точке бифуркации Андронова–Хопфа HB_1 . Синфазный предельный цикл не устойчив во всей области существования по параметру Q .

Колебательный режим для системы с расталкивающей связью представлен противофазными осцилляциями, которые устойчивы при малых значениях связи (рис. 8). Противофазный предельный цикл рождается в точке бифуркации Андронова–Хопфа HB_2 . Между двумя бифуркациями рождения инвариантного тора (TR_1 и TR_2) на ветке противофазных колебаний обнаруживается режим динамического хаоса [Multistability of synthetic genetic networks ..., 2008].

Нужно заметить, что при изучении системы продолжением по параметру кворумной связи Q бифуркации рождения однородных предельных циклов HB_1 и HB_2 находятся вне физической значимой области параметра.

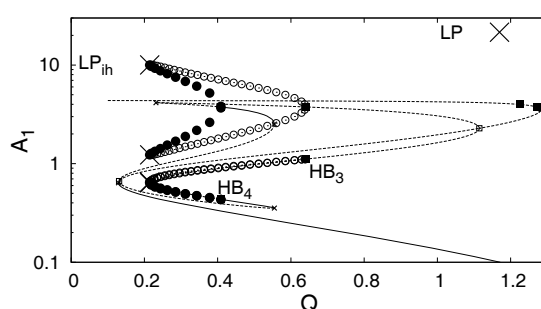


Рис. 9. Неоднородные колебания. Параметры — как на рис. 7

В точках бифуркации Андронова–Хопфа HB_3 и HB_4 на неоднородных стационарных ветках (рис. 7) рождается неоднородный предельный цикл: концентрации компонент двух осцилляторов колеблются с разными амплитудами. В определенном интервале изменяемого параметра этот режим становится устойчивым.

Однородное стационарное состояние

Этот режим становится устойчивым выше порогового значения параметра $Q_{crit} = Q(LP_2)$ (рис. 7). На рис. 10 показано изменение этого значения в зависимости от скорости транскрипции α . При $Q_{crit} = 0$ значение $\alpha = \alpha(LP_L)$, в котором становится устойчивым стационарное состояние для изолированного осциллятора (см. разд. изолированный репрессилатор...).

Неоднородные решения

На рис. 11 показано изменение границ (LP_3 и HB_4) устойчивости неоднородного стационарного состояния в единицах Q в зависимости от скорости транскрипции α . Из рисунка можно сделать вывод о том, что устойчивое неоднородное стационарное состояние не существует ниже определенного порогового значения α (кривая LP_3 - LP_4).

Неоднородный предельный цикл устойчив между точками бифуркаций HB_4 и LP_{ihlc} (LP_{ih} на рис. 9). На рис. 11 видно изменение этих границ на плоскости Q - α . Из рисунка видно, что ниже определенного значения скорости транскрипции α неоднородные колебания не выявляются (кривая HB_3 - HB_4).

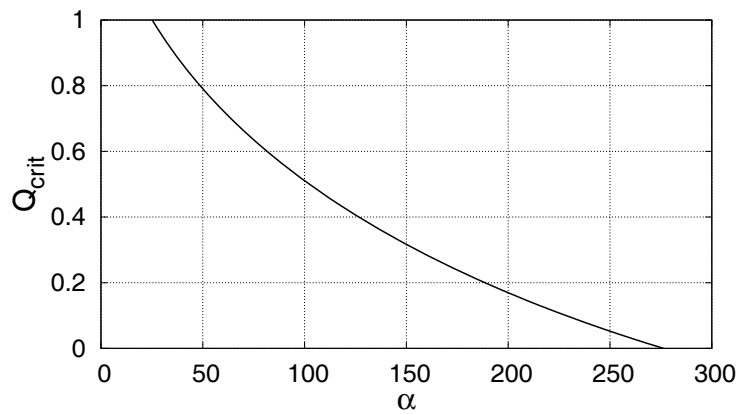


Рис. 10. Пороговое значение Q_{crit} появления однородного стационарного решения в зависимости от скорости транскрипции α . Остальные параметры — как на рис. 7

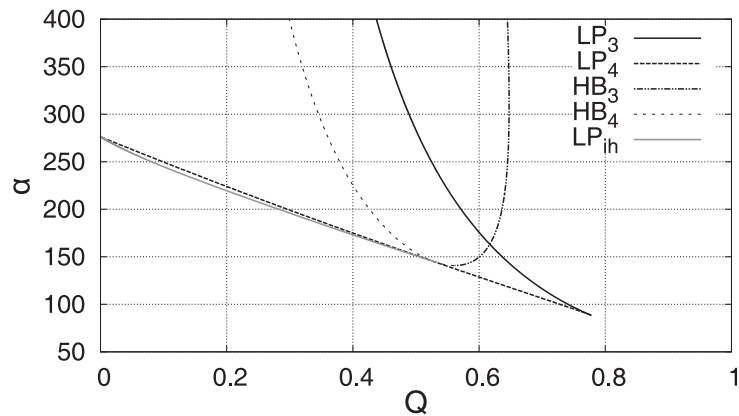


Рис. 11. Двухпараметрическое продолжение точек бифуркаций на неоднородных ветках решений как границ характерных режимов. Параметры — как на рис. 7

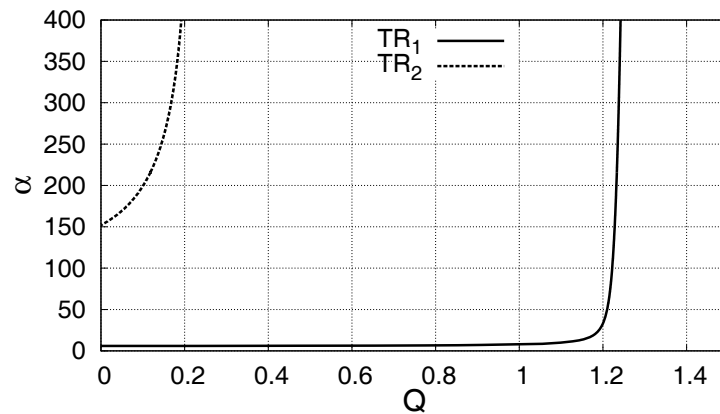


Рис. 12. Изменение границ в единицах силы связи Q существования режима динамического хаоса в зависимости от скорости транскрипции. Параметры — как на рис. 7

Динамический хаос

Границами существования режима динамического хаоса являются точки бифуркации TR_1 и TR_2 [Multistability of synthetic genetic networks ..., 2008] (рис. 8). Изменение этих границ

в единицах силы связи Q в зависимости от скорости транскрипции показано на рис. 12. Противофазное решение становится устойчивым при $Q < Q(TR_2)$, поэтому ниже определенного порогового значения α всю физическую область параметра Q занимает режим динамического хаоса.

Анализ по скорости транскрипции

Рассмотрим динамику системы, проводя бифуркационный анализ по параметру скорости транскрипции α , при фиксированном значении параметра кворумного взаимодействия Q . В этом случае продолжение начинается с единственного устойчивого однородного стационарного состояния при малых значениях параметра и выявляет последовательность бифуркаций появления периодических решений. Оказывается, что такой подход дополняет бифуркационный анализ по связи Q : при изменении скорости транскрипции выявляются новые динамические режимы.

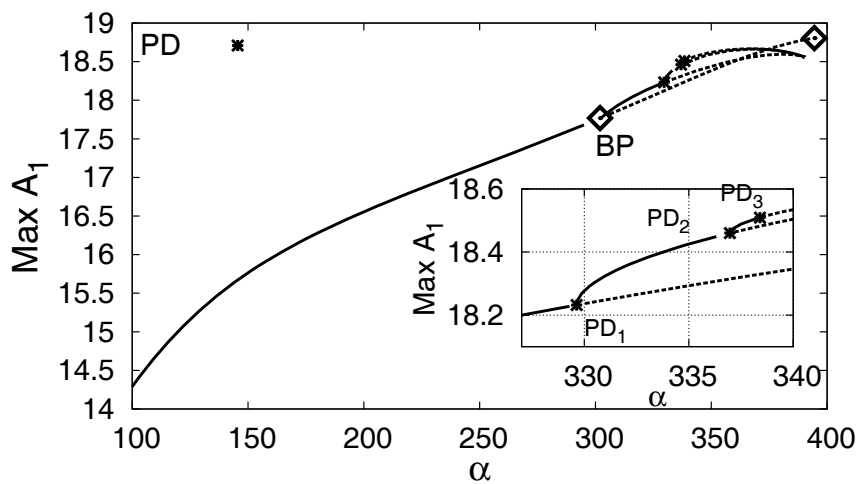


Рис. 13. Продолжение противофазного решения по параметру α (скорость транскрипции) при фиксированной силе связи $Q = 0,1$. Устойчивое колебательное решение показано сплошной линией, неустойчивое — пунктиром. Для простоты показано только максимальное значение переменной, а также только одна из возможных ветка решений после бифуркации потери симметрии BP и каждой бифуркации PD удвоения периода. Остальные параметры — как на рис. 7

Так, на рис. 13 при продолжении противофазного предельного цикла после бифуркации потери симметрии BP появляется несимметричное противофазное решение, выраженное в неравенстве амплитуд колебаний концентраций компонент в двух клетках (рис. 14). Этот режим теряет устойчивость после бифуркации удвоения периода PD₁. После точки PD₁ появляются колебания с увеличенным периодом. На ветке этого решения появляется еще одна бифуркация удвоения периода PD₂. За PD₂ появляется еще одно устойчивое решение, содержащее бифуркацию удвоения периода PD₃ и т. д. На рис. 13 для простоты показан каскад из трех PD.

Для каскада бифуркаций удвоения периода были посчитаны величины:

$$\delta_k = \frac{\alpha_{k+1} - \alpha_k}{\alpha_{k+2} - \alpha_{k+1}},$$

где α_k — бифуркационное значение α в точке PD_k.

В связи с трудностями вычисления бифуркационных диаграмм мы используем большие значения $\beta_i = 0,25$ для расчета величин δ_k . Для пяти бифуркаций PD получаем:

$$\delta_1 = 5,284738; \quad \delta_2 = 4,806569; \quad \delta_3 = 4,800000.$$

Напомним, что постоянная Фейгенбаума:

$$\delta = \lim_{k \rightarrow \infty} \frac{\alpha_{k+1} - \alpha_k}{\alpha_{k+2} - \alpha_{k+1}} \equiv 4,669201.$$

На примере трех значений δ_k видно приближение сверху к пределу δ . Таким образом, можно полагать, что система демонстрирует переход к хаосу по сценарию Фейгенбаума [Feigenbaum, 1978].

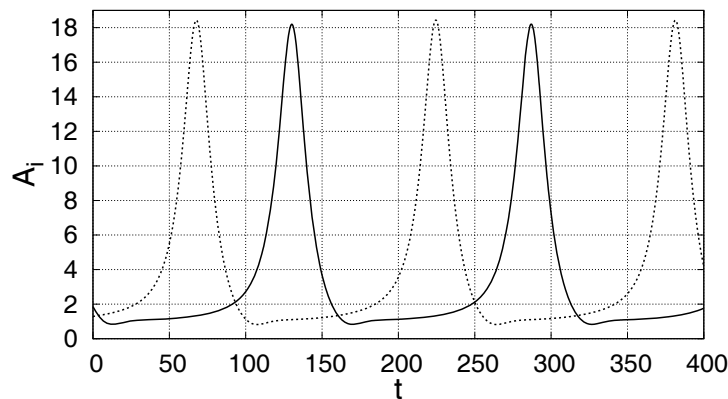


Рис. 14. Несимметричное противофазное решение: развертка во времени (t). Амплитуды колебаний белков A_1 и A_2 двух клеток не равны. Можно видеть, что разность фаз не равна половине периода $\alpha = 327$. Остальные параметры — как на рис. 7

Рассмотрим продолжение противофазного предельного цикла при больших силах связи Q . На рис. 15 видна качественно иная структура диаграммы продолжения противофазного предельного цикла по скорости транскрипции α при больших силах связи Q . Противофазный колебательный режим устойчив до точки бифуркации рождения инвариантного тора TR, после которой устойчивость противофазного решения теряется, и вопрос о существовании какого-либо устойчивого ритма в этой области остается открытым.

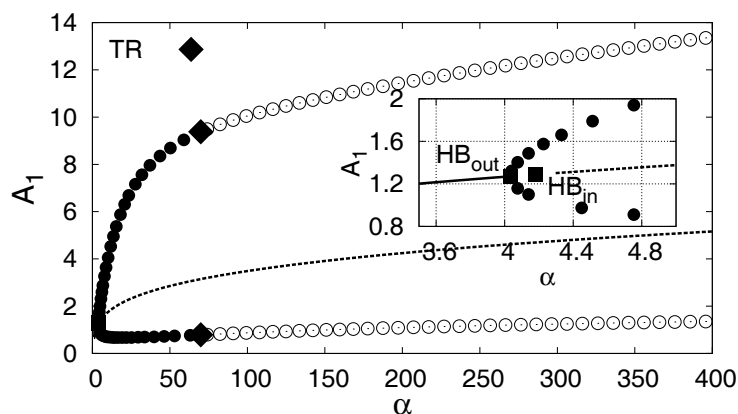


Рис. 15. Рождение и продолжение противофазного предельного цикла по параметру скорости транскрипции α при больших значениях силы связи $Q = 0,5$. TR — бифуркация рождения инвариантного тора. Остальные параметры — как на рис. 7

Заключение

Исследование искусственных генетических осцилляторов важно для понимания природных генных сетей, а также для биотехнологических приложений. Искусственные осцил-

ляторы должны быть снабжены механизмами активного взаимодействия, чтобы производить коллективный эффект на динамику популяции.

Мы рассмотрели генетический осциллятор, репрессилатор, оснащенный системой связи (кворум-сенсинг), которая чувствительна к плотности клеточной популяции и внедрена таким образом, чтобы обеспечивать расталкивающее взаимодействие [Multistability of synthetic genetic networks . . . , 2008], и показали, что обмен аутоиндуктором, стимулирующим производство мРНК s_i , одной из компонент ядра осциллятора и производящимся другой компонентой осциллятора — белком B_i , обеспечивает появление устойчивого стационарного решения в системе изолированного осциллятора, которое при определенных условиях, накладываемых на соотношения времен жизни мРНК и белка β_i , может служить причиной прекращения колебаний.

Мы определили границы характерных режимов, продемонстрированных ранее в [Multistability of synthetic genetic networks . . . , 2008], для двух связанных осцилляторов на двухпараметрической области параметров «скорость транскрипции»–«сила кворумного взаимодействия» (α – Q).

Мы провели дополнительный бифуркационный анализ системы из двух связанных осцилляторов по параметру скорости транскрипции α и дополнили общую картину динамических режимов модели несимметричными противофазными колебаниями, а также противофазными колебаниями, возникающими при последовательных бифуркациях удвоения периода, которые, в свою очередь, ведут к режиму динамического хаоса по сценарию Фейгенбаума.

Список литературы

- Atkinson M., Savageau M., Myers J., Ninfa A. Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in *Escherichia coli* // Cell — 2003. — Vol. 113 — P. 597–607
- Danino T., Mondragón-Palomino O., Tsimring L., Hasty J. A synchronized quorum of genetic clocks // Nature — 2010. — Vol. 463 — P. 326–330.
- Dockery J., Keener J. A mathematical model for quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Bull. Math. Biol. — 2001. — Vol. 63 — P. 95–116.
- Doedel E. AUTO: A program for the automatic bifurcation analysis of autonomous systems // Cong. Num. : Proc. 10th Manitoba Conf. on Num. Math. and Comp., Winnipeg, Canada: University of Manitoba, 1981. — Vol. 30 — P. 265–284.
- Elowitz M., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators // Nature — 2000. — Vol. 403 — P. 335–338.
- Feigenbaum M. Quantitative universality for a class of nonlinear transformations // J. Stat. Phys. — 1978. — Vol. 19, № 1 — P. 25–52.
- García-Ojalvo J., Elowitz M., Strogatz S. Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2004. — Vol. 101 — P. 10955.
- Gardner T., Cantor C., Collins J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli* // Nature — 2000. — Vol. 403 — P. 339–342.
- McMillen D., Kopell N., Hasty J., Collins J. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signalling // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2002. — Vol. 99 — P. 679.
- De Monte S., d'Ovidio F., Danø S., Sørensen P. Dynamical quorum sensing: Population density encoded in cellular dynamics // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2007. — Vol. 104, № 47 — P. 18377–18381.
- Müller S., Hofbauer J., Endler L., Flamm C., Widder S., Schuster P. A generalized model of the repressilator // J. Math. Biol. — 2006. — Vol. 53 — P. 905–937.
- Stricker J., Cookson S., Bennet M., Mather W., Tsimring L., Hasty J. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator // Nature — 2008. — Vol. 456 — P. 516–519.

- Tigges M., Marquez-Lago T., Stelling J., Fussenegger M.* A tunable synthetic mammalian oscillator // *Nature* — 2009. — Vol. 457 — P. 309–312.
- Ullner E., Koseska A., Kurths J., Volkov E., Kantz H., Garcia-Ojalvo J.* Multistability of synthetic genetic networks with repressive cell-to-cell communication // *Phys. Rev. E.* — 2008. — Vol. 78 — P. 031904.
- Ullner E., Zaikin A., Volkov E., Garcia-Ojalvo J.* Multistability and clustering in a population of synthetic genetic oscillators via phase-repulsive cell-to-cell communication // *Phys. Rev. L.* — 2007. — Vol. 99 — P. 148103.
- Waters C., Bassler B.* Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2005. — Vol. 21 — P. 319–346.
- Zhou T., Zhang J., Yuan Z., Chen L.* Synchronization of genetic oscillators // *Chaos* — 2008. — Vol. 18 — P. 037126.
- Григоров Л. Н., Полякова М. С., Чернавский Д. С.* Модельное исследование триггерных схем и процесса дифференциации // *Молек. биология* — 1967. — Т. 1 № 3. — P. 410–418.
- Ризниченко Г. Ю.* Лекции по математическим моделям в биологии. — М.-Ижевск: РХД, 2002.